

Спектрофотометричне визначення фенілаланіну і триптофану

Микола Клещев, Тетяна Костиркіна, Наталія Масалітіна

*Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»,
Харків*

sev1703@bk.ru

Вступ. Фенілаланін і триптофан можна визначати хроматографічним, титриметричним чи спектрофотометричним методами [1-4]. Найпростішим є спектрофотометричний метод визначення за їх поглинанням в ультрафіолетовій (УФ) області спектру. Найповніші дані є в роботі [1], авторами якої пропонується визначати фенілаланін при $pH = 5,2 - 9,5$ в інтервалі концентрацій $(0,5 - 5,5) \cdot 10^{-3}$ і триптофан при $pH = 3,0 - 9,2$ в інтервалі концентрацій $(0,4 - 1,5) \cdot 10^{-4}$ М. Метою цієї роботи є розширення діапазону визначуваних концентрацій цих амінокислот за інтенсивністю поглинання в УФ області. Для цього досліджувалися їх спектрофотометричні аналітичні характеристики в широкому інтервалі кислотності та концентрації і стабільність аналітичного сигналу при зберіганні розчинів.

Матеріали і методи. Для розчинення амінокислот використовувалася вода, що є універсальним розчинником при спектрофотометрії амінокислот і має нижню межу пропускання 210 нм. Для роботи була вибрана близька УФ область спектру в інтервалі 220–400 нм. Вихідні 0,01 М розчини готували за точними наважками амінокислот, розчини менших концентрацій – розбавленням вихідних розчинів. Для отримання розчинів амінокислоти з $pH < pI$ використовували розчин хлоридної кислоти, з $pH > pI$ – розчин натрію гідроксиду. Для роботи використовували спектрофотометр СФ-26 правильність роботи якого перевірялася за стандартними розчинами калію діхромату [2] та рН-метр рН-340, градуйований за стандартними буферними розчинами згідно з інструкцією до роботи приладу та використовували кювети з товщиною поглинаючого шару 1 см.

Результати. Дослідження спектрів поглинання амінокислот у водному розчині, у розчині хлоридної кислоти та у розчині гідроксиду натрію показало, що положення максимумів смуг поглинання практично не змінюються із зміною кислотності розчинів в широкому інтервалі кислотності, від кислого (2 М HCl) і до лужного середовища (3 М NaOH), і є в області 258 нм для фенілаланіну і 280 нм для триптофану, що близько до літературних даних [1].

При спектрофотометричних дослідженнях одним із основних показників є стійкість аналітичного сигналу в процесі зберігання розчинів. Оптична густина розчину фенілаланіну з часом незначно падає: через перші 5 год на 0,005, через 48 год – на 0,02, тобто перші п'ять годин практично не змінюється. Оптична густина розчину триптофану з часом незначно падає: за перші 0,5 год на 0,02, а потім за наступні 4,5 год ще на 0,01 і через 48 год зменшується на 0,07 одиниць в порівнянні з початковим значенням. Тобто, можна вважати, що через 0,5 год після розбавлення оптична густина розчину триптофану впродовж п'яти годин

практично не змінюється.

Для визначення оптимальних значень рН визначення амінокислот досліджувалися залежності оптичної густини розчинів від рН. Для фенілаланіну в інтервалах рН 1 – 3; рН 5– 9; рН 12,5 – 3 М NaOH оптична густина має постійне, хоч і неоднакове, значення. Аналогічна картина має місце для триптофану в інтервалах рН 3–9; рН 12–3 М NaOH. Така залежність вказує на існування переважно однієї із форм цвіттерлітів амінокислот при різних значеннях рН. Довжини хвиль максимального поглинання практично однакові при різній кислотності розчинів для кожної амінокислоти, але інтенсивність поглинання різна. Розраховано молярні коефіцієнти поглинання в кислій, нейтральній і лужній областях, що становлять для фенілаланіну 164 ± 18 ; 178 ± 22 ; 206 ± 20 відповідно, а для триптофану 5600 ± 190 при рН 5,9 та 8800 ± 205 в 2 М розчині NaOH. Ці дані показують доцільність визначення фенілаланіну і триптофану в лужному середовищі. Побудовані та розраховані градувальні функції для визначення фенілаланіну і триптофану в 2 М розчині NaOH. Для визначення фенілаланіну при $\lambda = 258$ нм: $y = 192,5 \cdot x$ та для визначення триптофану при $\lambda = 280$ нм: $y = 8596,6 \cdot x$.

Висновки. Приведено результати дослідження основних спектрофотометричних характеристик фенілаланіну та триптофану в ультрафіолетовій області та запропоновано оптимальні умови їх визначення: середовище $-0,01$ – 2 М розчин NaOH; $\lambda = 258$ нм для фенілаланіну та 280 нм для триптофану, інтервал концентрацій $(0,1$ – $8,0) \cdot 10^{-3}$ М для фенілаланіну та $(0,1$ – $2,0) \cdot 10^{-4}$ М для триптофану, що дає можливість розширити діапазон визначуваних концентрацій цих амінокислот.

Література

1. Котова Д.Л. Спектрофотометрическое определение аминокислот в водных растворах / Д.Л. Котова, Т.А. Крысанова, Т.В. Елисеева.– Учебное пособие. Воронеж: Воронежский государственный университет, 2004.– 55 с.
2. Бабко А.К. Фотометрический анализ. Общие сведения и аппаратура / А.К. Бабко, А.Т. Пилипенко.– М.: Химия, 1968.– 387 с Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / Пер. с англ. / Под ред. Овчинникова Ю.А.– М.: Мир, 1974.– 461 с.
3. Крешков А.П. Основы аналитической химии. Т.3. / А.П. Крешков.- М.: Химия.- 472 с.
4. Филиппович Ю.Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, М.И. Севастьянова.– М.: Просвещение, 1982.– 311 с.